

## 中药饮片微生物限度检查法

中药饮片微生物限度检查法用于检查中药材及中药饮片的微生物污染程度。  
~~包括微生物计数和控制菌检查。检查项目微生物计数~~包括需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、~~和耐热菌总数检查。控制菌检查包括、~~耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌、沙门菌~~的检查。~~本通则中的耐热菌系供试液置水浴(98℃-100℃)30 分钟处理后按需氧菌总数测定方法检出菌的总称。

中药饮片微生物限度检查的试验环境应符合微生物限度检查的要求。检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染,防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。单向流空气区域、工作台面及环境应定期进行监测。

### 微生物计数

#### 培养基适用性检查和方法适用性试验

供试品微生物计数中所使用的培养基应进行适用性检查。

供试品的微生物计数方法应进行方法适用性试验,以确认所采用的方法适合于该产品的微生物计数。

若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时,计数方法应重新进行适用性试验。

#### 1. 菌种及菌液制备、~~培养基适用性检查~~

~~照非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则 1105)中“培养基适用性检查和方法适用性试验”项下进行。~~

菌种 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代(从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 0 代),并采用适宜的菌种保藏技术进行保存,以保证试验菌株的生物学特性。计数培养基适用性检查 and 计数方法适用性试验用菌株见表 1。

菌液制备 按表 1 规定程序培养各试验菌株。取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的新鲜培养物,用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液;取黑曲霉的新鲜培养物加入适量含 0.05%聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后,采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用含 0.05%聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶

液制成适宜浓度的黑曲霉孢子悬液。

菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在 24 小时内使用。稳定的黑曲霉孢子悬液可保存在 2~8℃，在验证过的贮存期内使用。

表 1 试验菌液的制备和使用

试验菌株	试验菌液的制备	计数培养基适用性检查		计数方法适用性试验	
		需氧菌 总数、耐热菌总 数计数	霉菌和酵母菌 总数计数	需氧菌 总数、耐热菌总 数计数	霉菌和酵母菌 总数计数
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) (CMCC(B) 26 003)	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或大豆胨液体培养基（MPN）法，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
铜绿假单胞菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) (CMCC(B) 10104)	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基（MPN 法），培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
枯草芽孢杆菌 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) (CMCC(B) 63501)	胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间 18~24 小时	胰酪大豆胨琼脂培养基和胰酪大豆胨液体培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu		胰酪大豆胨琼脂培养基或酪大豆胨液体培养基（MPN 法），培养温度 30~35℃，培养时间不超过 3 天，接种量不大于 100cfu	
白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> ) (CMCC(F) 98001)	沙氏葡萄糖琼脂培养基或沙氏葡萄糖液体培养基，培养温度 20~25℃，培养时间 2~3 天	胰酪大豆胨琼脂培养基，培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	胰酪大豆胨琼脂培养基（MPN 法不适用），培养温度 30~35℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基，培养温度 20~25℃，培养时间不超过 5 天，接种量不大于 100cfu

黑曲霉 ( <i>Aspergillusniger</i> ) (CMCC(F) 98003)	沙氏葡萄糖琼脂培养基或马铃薯葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间 5~7 天,或直到获得丰富的孢子	胰酪大豆胨琼脂培养基,培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	胰酪大豆胨琼脂培养基 (MPN 法不适用),培养温度 30~35℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu	沙氏葡萄糖琼脂培养基,培养温度 20~25℃,培养时间不超过 5 天,接种量不大于 100cfu
--	--	--	--	---	--

注:当需用玫瑰红钠琼脂培养基测定霉菌和酵母菌总数时,应进行培养基适用性检查,检查方法同沙氏葡萄糖琼脂培养基。

2. 培养基适用性检查

微生物计数用的成品培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基适用性检查。

按表 1 规定,接种不大于 100cfu 的菌液至胰酪大豆胨液体培养基管或胰酪大豆胨琼脂培养基平板或沙氏葡萄糖琼脂培养基平板,置表 1 规定条件下培养。每一试验菌株平行制备 2 管或 2 平板。同时,用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在 0.5-2 范围内,且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致;被检液体培养基管与对照培养基管比较,试验菌应生长良好。

2.3. 方法适用性试验

供试液制备取供试品,置适量的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,或 pH7.2 磷酸盐缓冲液,或胰酪大豆胨液体培养基中使成 1:10 供试液,充分振摇荡洗(不少于 15 分钟)或用有隔均质袋处理,取其液体作为供试液。取上述 1:10 供试液适量,置水浴(98℃-100℃)30 分钟处理后迅速冷却,作为耐热菌总数测定用供试液。分散力较差的供试品,可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1% 聚山梨酯 80,使供试品分散均匀。若需要,调节供试液 pH 值至 6~8。然后用同一稀释液将供试液进一步 10 倍系列稀释。供试液从制备至加入检验用培养基,不得超过 1 小时。

接种和稀释 按表 1 规定及下列要求进行供试液的接种和稀释,制备微生物回收试验用供试液。所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%。一般选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。若供试品污染的微生物数较多,低稀释级供试液可能影响微生物回收结果,因此,应选择低微生物污染的样品或选择适宜稀释级的供试液进行方法适用性试验。

(1) **试验组** 取上述制备好的供试液，加入试验菌液，混匀，使每 1ml 供试液加菌量不大于 100cfu。

(2) **供试品对照组** 取制备好的供试液，以稀释液代替菌液同试验组操作。

(3) **菌液对照组** 取不含中和剂及灭活剂的相应稀释液替代供试液,按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

**供试品中微生物的回收** 计数方法适用性试验用的各试验菌应逐一进行微生物回收试验。微生物的回收一般采用平皿法。每株试验菌每种培养基至少制备 2 个平皿，以算术均值作为计数结果。

取上述“试验组”制备的供试液 1ml，置直径 90mm 的无菌平皿中，注入 15～20ml 温度不超过 45℃熔化的胰酪大豆胨琼脂或沙氏葡萄糖琼脂培养基，混匀，凝固，倒置培养。若使用直径较大的平皿，培养基的用量应相应增加。按规定的条件培养、计数。同法测定供试品对照组及菌液对照组菌数。计算各组平均菌落数。

**结果判断** 计数方法适用性试验中，试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌液对照组菌落数的比值应在 0.5～2 范围内。若各试验菌的回收试验均符合要求，照所用的供试液制备方法及计数方法进行该供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、及耐热菌**总数**计数。若因供试品抗菌活性或溶解性较差等原因导致试验菌的回收试验不符合要求，将供试液进行进一步的稀释或采用其它适宜的方法处理，重新进行方法适用性试验。

## 供试品检查

### 1.抽样量

除另有规定外，参照药材和饮片取样法（通则 0211)抽取试验样品，大包装饮片每批抽取 100～500g，混匀；独立小包装饮片按装量抽取 100～500g 的包装数。

### 2.检验量

即一次试验所用的供试品量。除另有规定外,中药饮片的检验量为 25g。贵重品种或密度较小品种（如金银花、穿心莲、夏枯草）等可酌减，如 10g。

### 3.供试品的检查

供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数及耐热菌总数测定一般采用平皿

法。用胰酪大豆胨琼脂培养基测定需氧菌总数和耐热菌总数，用沙氏葡萄糖琼脂培养基测定霉菌和酵母菌总数。

**阴性对照试验** 以稀释液代替供试液进行阴性对照试验，阴性对照试验应无菌生长。如果阴性对照有菌生长，应进行偏差调查。

**供试液制备** 除另有规定外，取规定量供试品，按计数方法适用性试验确认的方法进行供试液制备，并进行 10 倍系列稀释。

~~取 10ml 上述 1:10 供试液，置水浴(98℃-100℃)30 分钟处理后迅速冷却，作为供试液进行耐热菌数测定，必要时，制备 10 倍系列稀释液。~~

**供试品检查** ~~供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数及耐热菌数测定采用平皿法。用胰酪大豆胨琼脂培养基测定需氧菌总数和耐热菌，沙氏葡萄糖琼脂培养基测定霉菌和酵母菌总数。按方法适用性试验确认的菌数测定方法，~~取上述供试品系列稀释液 2~3 级进行菌数测定，每稀释级每种培养基至少制备 2 个平板。

**培养和计数** 除另有规定外，胰酪大豆胨琼脂培养基平板在 30~35℃ 培养 3~5 天，沙氏葡萄糖琼脂培养基平板在 20~25℃ 培养 5~7 天，观察菌落生长情况，点计平板上生长的所有菌落数，计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后，计算各稀释级供试液的平均菌落数，按菌数报告规则报告菌数。若同稀释级两个平板的菌落数平均值不小于 15，则两个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上。

需氧菌总数是指胰酪大豆胨琼脂培养基上生长的总菌落数（包括真菌菌落数）；霉菌和酵母菌总数是指沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的总菌落数（包括细菌菌落数）。若因沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的细菌使霉菌和酵母菌的计数结果不符合微生物限度要求，可使用含抗生素（如氯霉素、庆大霉素）的沙氏葡萄糖琼脂培养基或其他选择性培养基（如玫瑰红钠琼脂培养基）进行霉菌和酵母菌总数测定。使用选择性培养基时，应进行培养基适用性检查。

#### 4. 菌数报告规则

需氧菌总数及耐热菌测定宜选取平均菌落数小于 300cfu 的稀释级、霉菌和酵母菌总数测定宜选取平均菌落数小于 100cfu 的稀释级，作为菌数报告的依据。取最高的平均菌落数，计算 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 供试品中所含的微生物数，取两位有效数字报告。

如各稀释级的平板均无菌落生长，或仅最低稀释级的平板有菌落生长，但平均菌落数小于 1 时，以 < 1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

## 控制菌检查

### 培养基适用性检查和方法适用性试验

供试品控制菌检查中所使用的培养基应进行适用性检查。

供试品的控制菌检查方法应进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该产品的控制菌检查。

若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时，控制菌检查方法应重新进行适用性试验。

#### 1. 菌种及菌液制备、~~培养基适用性检查~~

~~照非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法（通则 1106）中“培养基适用性检查和方法适用性试验”项下进行。~~

**菌种** 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代（从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌株的生物学特性。

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (CMCC (B) 10 104)

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) (CMCC (B) 44 102)

乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi B*) (CMCC (B) 50 094)

**菌液制备** 将铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、沙门菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中或在胰酪大豆胨琼脂培养基上，30~35℃ 培养 18~24 小时。上述培养物用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液。

菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，可在 24 小时内使用。

#### 2. 培养基适用性检查

控制菌检查用的成品培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基的适用性检查。

控制菌检查用培养基的适用性检查项目包括促生长能力、抑制能力及指示特

性的检查。各培养基的检查项目及所用的菌株见表 2。

表 2 控制菌检查用培养基的促生长能力、抑制能力和指示特性

控制菌检查	培养基	特性	试验菌株
耐胆盐革兰 阴性菌	肠道菌增菌液体培养基	促生长能力	大肠埃希菌
		抑制能力	铜绿假单胞菌
	紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基	促生长能力+指示特性	金黄色葡萄球菌
			大肠埃希菌
大肠埃希菌	麦康凯液体培养基	促生长能力	大肠埃希菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	麦康凯琼脂培养基	促生长能力+指示特性	大肠埃希菌
沙门菌	RV 沙门菌增菌液体培养基	促生长能力	乙型副伤寒沙门菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基	促生长能力+指示特性	乙型副伤寒沙门菌
	三糖铁琼脂培养基	指示能力	乙型副伤寒沙门菌

液体培养基促生长能力检查 分别接种不大于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基中，在相应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养，与对照培养基管比较，被检培养基管试验菌应生长良好。

固体培养基促生长能力检查 用涂布法分别接种不大于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基平板上，在相应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养，被检培养基与对照培养基上生长的菌落大小、形态特征应一致。

培养基抑制能力检查 接种不少于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基中，在相应控制菌检查规定的培养温度及不小于规定的最长培养时间下培养，试验菌应不得生长。

**培养基指示特性检查** 用涂布法分别接种不大于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基平板上，在相应控制菌检查规定的培养温度及不大于规定的最短培养时间下培养，被检培养基上试验菌生长的菌落大小、形态特征、指示剂反应情况等应与对照培养基一致。

### 23. 控制菌检查方法适用性试验

**供试液制备** 按下列“供试品检查”中的规定制备供试液。

**试验菌** 根据各品种项下微生物限度标准中规定检查的控制菌选择相应试验菌株，确认耐胆盐革兰阴性菌检查方法时，采用大肠埃希菌和铜绿假单胞菌为试验菌。

**适用性试验** 取规定量供试液及不大于 100cfu 的试验菌接入规定的培养基中，依相应的控制菌检查方法，在规定的温度和最短时间下培养，应能检出相应控制菌。

**结果判断** 上述试验若检出相应控制菌，按此供试液制备法和控制菌检查方法进行供试品检查；否则，应采用适宜的方法（如培养基稀释或薄膜过滤方法）消除供试品的抑菌活性，并重新进行方法适用性试验。

### 供试品检查

供试品的控制菌检查应按经方法适用性试验确认的方法进行。

**阳性对照试验** 阳性对照试验方法同供试品的控制菌检查，对照菌的加量应不大于 100cfu。阳性对照试验应检出相应的控制菌。

**阴性对照试验** 以稀释剂代替供试液照相应控制菌检查法检查，阴性对照试验应无菌生长。如果阴性对照有菌生长，应进行偏差调查。

### 1. 耐胆盐革兰阴性菌(Bile-Tolerant Gram-Negative Bacteria)

**供试液制备和预培养** 取供试品，用胰酪大豆胨液体培养基作为稀释剂照上述“微生物计数”中“方法适用性试验”项下制成 1:10 供试液，混匀，在 20~25℃ 培养，培养时间应使供试品中的细菌充分恢复但不增殖（约 2 小时）。

**选择和分离培养** 取相当于 0.1g、0.01g 和 0.001g（或其它适宜的连续 3 级稀释液）供试品的预培养物分别接种至适宜体积（经方法适用性试验确定）的肠道菌增菌液体培养基中，供试液加入量不得超过培养基体积的 10%，30~35℃ 培养

24~48 小时。上述每一培养物分别划线接种于紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上，30~35℃培养 18~24 小时。

**结果判断** 若紫红胆盐葡萄糖琼脂培养基平板上有菌落生长，则对应培养管为阳性，否则为阴性。根据各培养管检查结果，从表 43 查 1g 或 1ml 供试品中含有耐胆盐革兰阴性菌的可能菌数。

表 43 耐胆盐革兰阴性菌的可能菌数 (N)

各供试品量的检查结果			每 1g(或 1ml)供试品中可能的菌数 cfu
0.1g 或 0.1ml	0.01g 或	0.001g 或	
+	+	+	$N > 10^3$
+	+	—	$10^2 < N < 10^3$
+	—	—	$10 < N < 10^2$
—	—	—	$N < 10$

注：(1)+代表紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上有菌落生长；—代表紫红胆盐葡萄糖琼脂平板上无菌落生长。

(2)若供试品量减少 10 倍（如 0.01g，0.001g，0.0001g），则每 1g 供试品中可能的菌数 (N) 应相应增加 10 倍。

## 2. 大肠埃希菌(*Escherichia coli*)

**供试液制备和增菌培养** 取供试品，照上述“微生物计数”中“方法适用性试验”项下制成 1: 10 供试液。取相当于 1g 供试品的供试液，接种至适宜体积（经方法适用性试验确定）的胰酪大豆胨液体培养基中，供试液加入量不超过培养基体积的 10%，混匀，30~35℃培养 18~24 小时。

**选择和分离培养** 取上述培养物 1ml 接种至 100ml 麦康凯液体培养基中，42~44℃培养 24~48 小时。取麦康凯液体培养物划线接种于麦康凯琼脂培养基平板上，30~35℃培养 18~72 小时。

**结果判断** 若麦康凯琼脂培养基平板上有菌落生长，应进行分离、纯化及适宜的鉴定试验，确证是否为大肠埃希菌；若麦康凯琼脂培养基平板上没有菌落生长，或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性，判供试品未检出大肠埃希菌。

## 3. 沙门菌 (*Salmonella*)

**供试液制备和增菌培养** 取 10g 供试品直接或处理后接种至适宜体积（经方法适用性试验确定）的胰酪大豆胨液体培养基中，混匀，30~35℃培养 18~24 小时。

**选择和分离培养** 取上述培养物 0.1mL 接种至 10mL RV 沙门增菌液体培养基中，30~35℃培养 18~24 小时。取少量 RV 沙门菌增菌液体培养物划线接种于木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上，30~35℃培养 18~48 小时。

沙门菌在木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上生长良好，菌落为淡红色或无色、透明或半透明、中心有或无黑色。用接种针挑选疑似菌落于三糖铁琼脂培养基高层斜面上进行斜面和高层穿刺接种，培养 18~24 小时，或采用其它适宜方法进一步鉴定。

**结果判断** 若木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上有疑似菌落生长，且三糖铁琼脂培养基的斜面为红色、底层为黄色，或斜面黄色、底层黄色或黑色，应进一步进行适宜的鉴定试验，确证是否为沙门菌。如果平板上没有菌落生长，或虽有菌落生长但鉴定结果为阴性，或三糖铁琼脂培养基的斜面未见红色、底层未见黄色；或斜面黄色、底层未见黄色或黑色，判供试品未检出沙门菌。

## 结果判断

各品种项下规定的微生物限度标准解释如下：

$10^1$ cfu：可接受的最大菌数为 50；

$10^2$ cfu：可接受的最大菌数为 500；

$10^3$ cfu：可接受的最大菌数为 5000；

$10^4$ cfu：可接受的最大菌数为 50000：依此类推。

供试品检出控制菌或其他致病菌时，按一次检出结果为准，不再复试。

若供试品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数、耐热菌总数、控制菌检查结果均符合该品种项下的规定，判供试品符合规定；若其中任何一项不符合该品种项下的规定，判供试品不符合规定。

## 稀释液、培养基及制备方法

见非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法（通则 1106）